

●マイコプラズマ rRNA 検出試薬 TRCReady[®] MP の開発

バイオサイエンス事業部 第二開発部 遺伝子グループ 塚本 悠
斎藤 寿一

1. はじめに

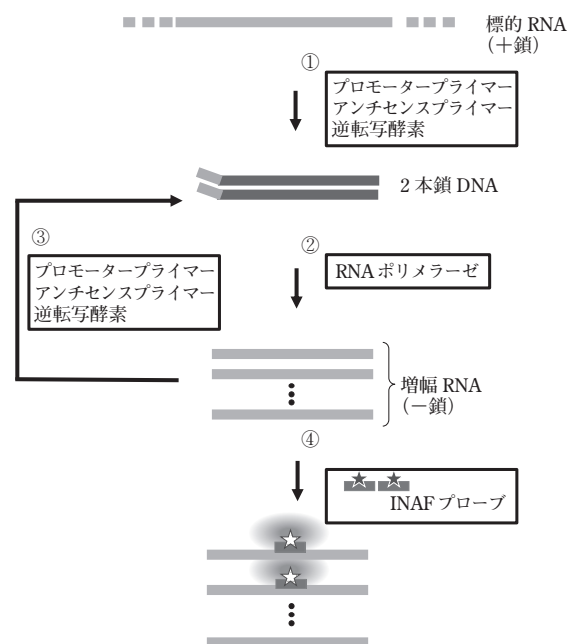
マイコプラズマニューモニエ (*Mycoplasma pneumoniae*, MP) は人に感染すると気管支炎と肺炎 (以下マイコプラズマ肺炎) といった疾患を引き起こす。非定型肺炎の多くがマイコプラズマ肺炎であり、市中肺炎としての頻度も高い。マイコプラズマ肺炎は呼吸不全などを呈する重症化や合併症を引き起こすこともあることから迅速・適切な治療が必要である。しかし、マイコプラズマニューモニエをはじめとする非定型肺炎起炎菌は通常外来でよく使用されるβ-ラクタム系の抗菌薬が効かないという特徴を有するため、マイコプラズマニューモニエの迅速・確実な検出は临床上重要である。現在マイコプラズマニューモニエの検出には培養法、抗体検査法、抗原検査法、遺伝子検査法の4種類が使用されている¹⁾。培養法は特殊な培地を使用する必要があり、また時間がかかるため、あまり普及していない。抗体検査法は信頼性の高い結果を得るためにペア血清を用いる必要があり、時間がかかる。抗原検査法は近年普及しており、検体採取後30分以内に結果が得られ迅速性は高いが、感度が低く確実な検出法とは言い難い。遺伝子検査法は検体採取後1時間程度で結果が得られ、また感度も高いため注目されているが、現行の検査は煩雑であり抗原検査法と比べ普及していない。

そこで、迅速、簡便、高感度な遺伝子検査法としてTRC法を用いたマイコプラズマ rRNA 検出試薬TRCReady[®] MPを開発したので報告する。

2. TRC法の原理と特徴

TRC法は46℃の一定温度でRNAを増幅するTRC (Transcription - Reverse transcription - Concerted) 反応と標的核酸に特異的に結合する事により蛍光を発するINAF (INtercalation Activating Fluorescence) プローブを組み合わせた方法であり、標的RNAの増幅と検出を1本のチューブ内で20~30分で実施できる²⁻³⁾ (図1)。さらに、専用装置である自動遺伝子検査装置

TRCReady[®]-80、TRCR[®] 核酸精製キットと組み合わせることにより、核酸精製から検出まで全自動で実施可能である (図2)。



- ①プロモーター配列を付加したプライマー、アンチセンスプライマーと逆転写酵素により標的 RNA から 2 本鎖 DNA が合成される
- ②RNA ポリメラーゼにより 標的 RNA の相補鎖 (一鎖) が増幅合成される
- ③増幅された RNA の一部からプロモーター配列を付加したプライマー、アンチセンスプライマーと逆転写酵素により 2 本鎖 DNA が合成される
- ④INAF (INtercalation Activating Fluorescence) プローブは増幅合成された RNA と特異的に結合し、蛍光強度が増加する

図1 TRC 反応原理図 (TRCReady MP)

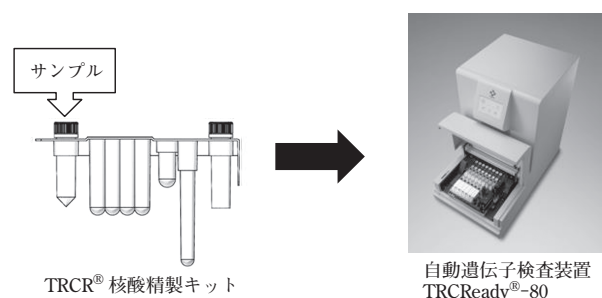


図2 TRCReady システム概要

3. マイコプラズマニューモニエ検出試薬の開発

マイコプラズマニューモニエの類縁菌としてはマイコプラズマジェニタリウムが知られており、開発において特異性を高くすることが課題であった。この課題を解決するため、マイコプラズマニューモニエの検出ターゲットとして23S rRNAを選択した。23S rRNAの配列には十分な差が見られたため、23S rRNAを検出ターゲットとすることにより高い特異性が期待できた。また、23S rRNAは1菌あたり約300～1000コピー存在すると言われており、ゲノムを標的とするのに比べ、高い感度が期待できた。

4. 検体前処理方法の開発

マイコプラズマニューモニエの遺伝子検査には咽頭拭い液と喀痰の2種類の検体を使用されていることが知られている。このため、それぞれの検体種に対し適切な前処理方法を開発する必要がある。咽頭拭い液に対してはTRCR[®]核酸精製キットにスワブを懸濁することにより、核酸を精製することが出来た。一方喀痰検体に関してはTRCR[®]核酸精製キットにて精製する前に、前処理を行う必要があった。今回前処理方法として、界面活性剤を用いて喀痰中のマイコプラズマニューモニエを溶菌させ、その上清をTRCR[®]核酸精製キットに持ち込むことで、喀痰由来の阻害成分を除き、マイコプラズマニューモニエの核酸のみを精製できる、従来法と比べ迅速、簡便な方法を開発した(図3)。本前処理法により、喀痰検体を10分程度で前処

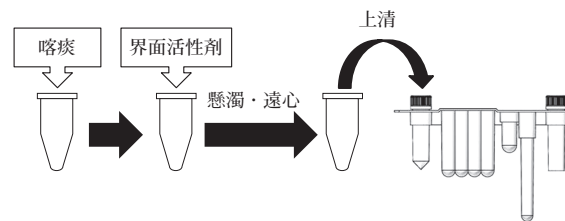


図3 喀痰検体の前処理

理可能である。

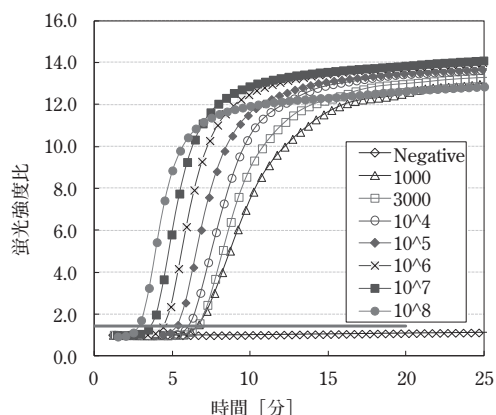
5. 基本性能評価

マイコプラズマニューモニエ 23SrRNA 溶液を開発したTRCReady MPで測定した結果を図4に示す。なお、図4において横軸は反応開始からの時間を示し、縦軸は蛍光強度比(蛍光強度/初期蛍光強度)を示している。そして、蛍光強度比が1.5を超えた時間を検出時間とした場合、TRCReady MPは $10^3 \sim 10^8$ コピー/テストの23S rRNAを7分以内に検出した。更に低い濃度の23S rRNAを測定した結果、10コピー/テストの23S rRNAまで検出することができた⁴⁾。

TRCReady MPの特異性試験の結果を表1に示す。なお、判定は反応開始後20分以内に蛍光強度比が1.5以上になった時に陽性、1.5未満の時を陰性とした。結果、TRCReady MPはマイコプラズマニューモニエ以外のマイコプラズマ属菌、肺炎原因菌を含む25菌種について、 10^6 CFU または23S rRNA 10^{10} コピーを測定したところ、全て陰性となった。

表1 特異性試験

菌種	株名	判定	菌種	株名	判定
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	NBRC 15126	陰性	<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606	陰性
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	NBRC 109760	陰性	<i>Escherichia coli</i>	JM 109	陰性
<i>Alcaligenes faecalis</i>	NBRC 14479	陰性	<i>Haemophilus influenzae</i>	IID 983	陰性
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	NBRC 14944	陰性	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	陰性
<i>Empedobacter brevis</i>	NBRC 14943	陰性	<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC 33152	陰性
<i>Flavobacterium odoratum</i>	NBRC 14945	陰性	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	NBRC 14165	陰性
<i>Moraxella catarrhalis</i>	ATCC 25238	陰性	<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 13880	陰性
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NBRC 12689	陰性	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 700699	陰性
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NBRC 14160	陰性	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 51625	陰性
<i>Mycoplasma hominis</i>	NBRC 14850	陰性	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	IID 554	陰性
<i>Mycoplasma salivarium</i>	NBRC 14478	陰性	<i>Streptococcus pyogenes</i>	GTC 262	陰性
<i>Mycoplasma fermentans</i>	NBRC 14854	陰性	<i>Mycoplasma genitalium</i>	ATCC 33530	陰性
<i>Mycoplasma orale</i>	NBRC 14477	陰性			



マイコプラズマニューモニエ 23S rRNA を 1 テストあたり $10^3 \sim 10^8$ コピーとしたときの、蛍光強度比の推移。横線はカットオフ値 1.5 を示す

図 4 蛍光強度比の推移

6. 実検体を用いた評価⁴⁻⁵⁾

[評価方法]

マイコプラズマニューモニエ感染が疑われた症例にて、全 220 検体（咽頭拭い液 110 検体、喀痰 110 検体）を使用し図 5 に示すフローにて評価した。TRC 法は TRCReady[®] MP と自動遺伝子検査装置 TRCReady[®]-80、TRCR[®] 核酸精製キットを組み合わせて精製、検出を行った。既承認 LAMP 法キットは株式会社ビー・エム・エルにて測定を行った。

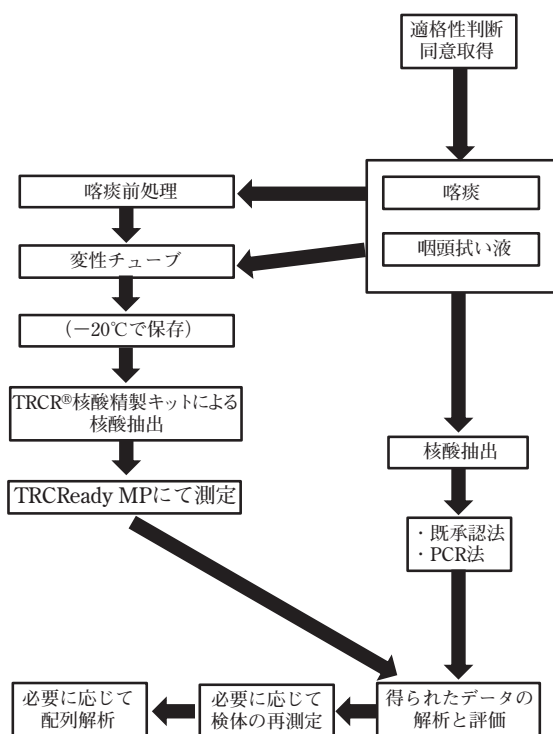


図 5 評価のフロー

[評価結果]

TRCReady MP と既承認品の相関性試験結果を表 2 に示す。全体一致率は 95.0%、陽性一致率が 100%、陰性一致率が 93.6%と 90%以上の良好な相関が得られた。TRCReady MP にて陰性となった検体で既承認品陽性となったものは無く、TRCReady MP の感度が高いことが示唆された。乖離した 11 検体のうち、9 検体に関しては配列解析を行い、TRCReady MP の増幅産物からマイコプラズマニューモニエ 23S rRNA 配列が検出された。残りの 2 検体に関しては配列解析が行われていない。

7. まとめ

既承認の他社遺伝子検査キットに比べ、マイコプラズマニューモニエを迅速、簡便に測定可能な試薬を開発した（表 3）。また、臨床検体を用いた評価でも既承認品と同等以上の感度、特異度を有していた。

8. 謝 辞

本研究は下記施設との共同研究又は受託研究として実施されました。臨床評価の実施に際し、厚く御礼申し上げます。

千葉大学真菌医学研究センター：

石和田 稔彦 先生

千葉大学医学部附属病院小児科：

長澤 耕男 先生、菱木 はるか 先生

千葉市立海浜病院小児科：

阿部 克昭 先生

表 2 相関性試験

全検体	既承認品		
	+	-	
TRCReady MP	+	47	11
	-	0	162

拭い液検体	既承認品		
	+	-	
TRCReady MP	+	39	9
	-	0	62

喀痰検体	既承認品		
	+	-	
TRCReady MP	+	8	2
	-	0	100

表3 既承認キットとの比較

	TRCReady MP (東ソー)	A社	B社
検査対象	RNA (23S rRNA)	DNA (SDC1 遺伝子)	DNA (23S 遺伝子)
測定原理	TRC法 (INAFプローブによるリアルタイム蛍光検出)	LAMP法	PCR法
所要時間	45分 (拭い液) 50分 (喀痰)	50分 (拭い液) 100分 (喀痰)	60分 (拭い液)
検体	喀痰・拭い液	喀痰・拭い液	咽頭拭い液
最小検出感度	RNA 1000 cp/テスト	DNA 15 cp/テスト	DNA 25cp/テスト
感度	100% (対既承認 LAMP 法キット)	100% (対既承認 LAMP 法キット)	100% (対既承認 LAMP 法キット)
特異度	93.6% (対既承認 LAMP 法キット)	100% (対既承認 LAMP 法キット)	95.8% (対既承認 LAMP 法キット)

他社キットの性能は添付文書より抜粋。所要時間は試算。

千葉市立海浜病院臨床検査科：

静野 健一 先生

国立病院機構刀根山病院：

北田 清悟 先生

国立病院機構東京医療センター小児科：

込山 修 先生

国立病院機構東京医療センター総合内科：

森 伸晃 先生

参考文献

- 1) 肺炎マイコプラズマ検査マニュアル、国立感染研究所 (2011)
- 2) T. Ishiguro *et al.*, *Anal. Biochem.*, 314 (1), 77 - 86 (2003)
- 3) 斎藤寿一、臨床病理、66 (5)、515-521、(2018)
- 4) N. Ishiwada *et al.*, *Jpn J Antibiot.*, in press
- 5) 森伸晃ら、第92回日本感染症学会学術講演抄録 (2018)